

FgEneo 抗体を用いた RIA 法による悪性腫瘍患者 血中FDP の測定とその臨床的意義

及 川 潤 一 新 津 洋司郎

札幌医科大学内科学第4講座 (主任 漆崎一朗 教授)

Measurement of Fibrinogen Degradation Product in the Circulation of Patients with Malignancies by a Radioimmunoassay Using Anti-Fragment Eneo Antibody and Its Clinical Implication

Junichi OIKAWA and Yoshiro NIITSU

Department of Internal Medicine (Section 4), Sapporo Medical College

(Chief : Prof. I. Urushizaki)

Fibrinogen or fibrin degradation products (FgDP or FDP) are frequently elevated in the sera of many cancer patients, reflecting the hypercoagulable state of the disease.

Since the hypercoagulable state may easily shift to disseminated intravascular coagulation as a result of various stimuli, an exact grasp of this state at an early stage is clinically important.

The measurement of FgDP or FDP, however, is presently based on relatively insensitive methods involving the haemagglutination inhibition test or latex agglutination test and the antibody used in these assays is not specific for FgDP or FDP but crossreacts with fibrinogen resulting in overestimation of the FDP value due to residual fibrinogen in serum.

In this context, we established a radioimmunoassay for fragment Eneo antigen (FgEneo) which does not exist on the fibrinogen molecule but is newly exposed on the surface of the FgE molecule by a conformational change caused by cleavage of fibrinogen by plasmin and applied it for the estimation of FgDP or FDP in the circulation of cancer patients.

The following results were obtained :

- 1) FgE and FgD, late degradation products of fibrinogen by plasmin, were successively separated by gel filtration on a Sephadex G-200 column and by column electrofocusing.
- 2) Anti-FgEneo antibody was obtained from anti-FgE serum by passage through an affinity column coupled with fibrinogen. This antibody did not form a precipitation line with FgE in the agar unless it contained poly ethyleneglycol, suggesting that the antibody is nonprecipitable.
- 3) A double antibody method of RIA was developed using the anti-FgEneo antibody. Clottable FgDP, such as FgX, FgY, 30 min-digests of fibrinogen by plasmin and 5 hrs.-digests of fibrin by plasmin crossreacted with anti-FgEneo antibody, whereas fibrinogen and FgD did not inhibit the reaction between FgE and anti-FgEneo antibody. It was therefore, possible to detect FgDP or FDP in plasma as well as in serum by this assay.
- 4) The FgEneo value of plasma was substantially higher than that of serum in both normal subjects and patients with malignancies, possibly due to elimination of clottable degradation products from serum by centrifugation.
- 5) In more than 60% of patients with malignancies, including cancers of the stomach, colon, pancreas, lung and liver, acute myelogenous leukemia and malignant lymphoma, serum FgEneo concentrations were elevated as compared to that of normal subjects. The elevation was more evident in plasma (78%), indicating that clottable FgDP or FDP increased in the plasma of cancer patients. In

patients with stomach cancer, both serum and plasma FgEneo values increased as the disease advanced.

6) When a leukemia patient with DIC was treated with heparin, the serum FgEneo value rapidly returned to the normal level, whereas the plasma FgEneo value remained high, reflecting the latent DIC.

These results suggested that measurement of FgEneo in circulation is clinically useful for detecting and monitoring the fibrinogenolysis and fibrinolysis in malignancy. In particular, plasma FgEneo level clearly reflected the hypercoagulable state at its early stage.

(Received September 27, 1982 and accepted December 13, 1982)

Key words: FgEneo, RIA, Malignancy, Plasma FDP, Hypercoagulable state

1 緒 言

担癌生体における凝固線溶能の異常は特徴的であり、種々の凝固因子が増加する一方、線溶能が低下するためにいわゆる過凝固状態を呈する。この過凝固状態に何らかの risk factor が加わると容易に多発性の血栓形成と2次線溶の亢進へと進み、終末像として播種性血管内凝固症候群(DIC)へと移行する。DICは重篤な出血傾向を主症状とし原疾患の病態を修飾するばかりか予後を左右する要因ともなる。したがって、悪性腫瘍においては過凝固状態あるいはDICの初期相を的確にとらえ、いち早く対処することが極めて重要な課題となってくる。その方法としては凝固亢進状態の把握と2次線溶の検出の2通りが考えられるが、その内最も広く用いられているのが後者、すなわち fibrin degradation product (FDP) を測定する方法である。従来 FDP の測定法として代表的なものには赤血球凝集阻止法 (HIT) 法¹⁾、latex 粒子凝集法 (Latex 法²⁾) 等があるが、これらの方法では凝集反応の end-point を倍数稀釈で判定するので判定者の主観が入り、また使用する試薬により特異性が異なるなど、測定感度、特異性、再現性に問題を残している。加えてこれらの検査で用いられる抗体の多くは抗フィブリノーゲン抗体であるために血清中に残存するフィブリノーゲンとも交叉反応を起こすという難点がある。

1973年、Gordon *et al.*³⁾ Rotsky *et al.*⁴⁾らは FDP の late product である fragment D, E を抗原としてフィブリノーゲンとは交叉反応を示さない抗血清 (抗 Neo 抗原血清) を作製し、それによる RIA 法を開発して上述の点で従来の方法より格段に優れていることを報告した。

今回、著者らは本法を用いて悪性腫瘍患者血中の FDP neo 値を検討したところ線溶亢進の初期相をいち

早くとらえる上できわめて有用であることを知ったので報告する。また、その際 fibrinogen degradation product (FgDP) の分離、精製にセファデックス G-200 を用いたカラムゲル濾過法と等電点電気泳動法を組み合わせたところ、これ迄の方法に比し大量に、分離の良い抽出が可能であることを知ったので併せて報告する。

2 方 法

2.1 FgDP の作製

2.1.1 フィブリノーゲンのプラスミンによる分解

Fibrinogen degradation product (FgDP) の作製は石川ら⁵⁾の方法に準じ、市販のヒトフィブリノーゲンを 0.055 M sod. citrate buffer (pH 7.4) で24時間透析後、終濃度を1%溶液とし、これにストレプトキナーゼを100単位/l(終濃度)に加え、37°Cでインキュベートし反応系に共存するプラスミノゲンを活性化することによりおこなった。反応開始後30分、1時間、3時間、5時間の各時点でトラジロールおよび ϵ -amino-N-caproic acid (EACA) を各々200単位/ml・0.2 M (終濃度) となるように加え反応を停止させた。

2.1.2 FgDP (FgD, FgE) の分離、精製

FgD, FgE の抽出はゲル濾過法とカラム等電点電気泳動法を組み合わせて行った。

まず上述のごとく作製した FgDP (5時間分解産物) 10 mg/ml をあらかじめ 0.1 M EACA を含む 0.055 M sod. citrate buffer (pH 7.4) で平衡化してあるセファデックス G-200 column (2.6×100 cm) に添加し、同バッファーで 13 ml/h の流速で溶出、5 ml ずつ分画採取した。次に流出される位置から FgD 及び FgE が含まれていると推察される第2のピークをコロジオンバックで濃縮し、カラム等電点電気泳動⁶⁾により FgD と FgE の分離をおこなった。すなわち、泳動装置として LKB

社製の Ampholine column 8101 (容量 123 ml) を使用し、泳動中は外套管に電子恒温装置 (早川電気製, TE-18 型) を接続させ灌流温度を 4°C に保った。Sucrose 濃度勾配は Ayod *et al.*⁷⁾ の方法にしたがい作製した。Dense solution は pH 4~6 域の Ampholine (LK B 社製) 溶液 2.25 ml に 50% sucrose (Schwarzmann 社製) 溶液 57.75 ml を加え全量を 60 ml とし less dense solution は同じく pH 4~6 域の Ampholine 0.75 ml と蒸留水 59.25 ml を混じり全量を 60 ml に調整した。試料溶液は 0.5 ml とし sucrose 濃度勾配作製の途中に加えた。カラム上端を陰極、下端を陽極とし電極液は各々 2% ethylene diamine および 2% リン酸溶液を使用した。泳動条件は 800 V で 48 時間とした。泳動後カラム下端のテフロン細管より proportioning pump を用いて流速 2 ml/min で溶出し各分画 1 ml ずつ採取した。次に各分画につき Beckman expandmatic SS-2 pH meter を用いて 20°C で pH を測定し、また島津 UV-200 spectrophotometer により波長 280 nm で吸光度を測定した。Carrier ampholine および sucrose は堀尾ら⁸⁾ にならない 2% 硫酸、蒸留水で順次透析をおこない除去した。

2.1.3 フィブリンのプラスミンによる分解

品田⁹⁾の方法に準じて市販のヒトフィブリノーゲン 9 容に対しストレプトキナーゼ 1 容 (100 u/ml) とトロニンビン 1 容 (5 NIH/ml) を同時に加え、5 時間後に 2.1.1 の頃と同様に EACA、トラジロールにて反応を停止させた。

2.2 蛋白質の定量

本実験における蛋白の定量はすべて Folin-lowry 法によった。

2.3 ポリアクリラマイドゲル電気泳動 (PAGE)

ゲルの作製は Clarke¹⁰⁾ にしたがった。すなわち 7% acrylamide 0.18% Bis, 0.028% N, N', : tetra methylethylene diamine (TEMED), 0.375 M Tris-HCl buffer (pH 8.9), 0.07% ammonium persulfate を混じた溶液を垂直に立てたガラス管 (0.5×7.5 cm) の高さ 7 cm まで満たし、これに蒸留水をすみやかに重層して約 1 時間室温に放置し、ゲルを重合させた。試料 50 μ l は 25% sucrose で等量に希釈しゲルの上部に重層した。電極液は 0.025 M Trizma base, 0.192 M glycine 溶液を用い、電気泳動は Buchler 社製 disc 電気泳動装置を使用、上方を陰極に下方を陽極として定電流 8 mA/tube で約 5 時間おこなった。泳動終了後ゲルをガラス管より取り出し室温で 1% amino black 10 B により 2 時間染色をおこない、次いで 7%

acetic acid 溶液により 24~36 時間脱色した。

2.4 Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel 電気泳動 (SDS-PAGE)

SDS-PAGE は Weber and Osborn¹¹⁾ の方法に準じて行った。ゲルの組成は 10% acrylamide, 0.27% Bis, 0.1% SDS 0.15% TEMED, 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7.2), 0.075% ammonium persulfate とし、直径 0.8 cm 長さ 12.5 cm のガラス管中で重合した。試料または標準蛋白溶液 (1 mg/ml) は 50% glycerol, 2% SDS (Schwarzmann 社製) を含む 0.02 M sod. phosphate buffer (pH 7.2) と等量混合し、これに 2-mercaptoethanol を終濃度 1% になる様に加え 37°C, 20 時間 インキュベートした後 0.05% bromphenolblue (BPB) 溶液を 1/4 量加えてその約 50 μ l をゲルに添加した。電極液は 0.1% SDS, 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7.0) を用い 2.3 の項で述べた電気泳動装置にて 200 V 定電圧で 5 時間泳動した。染色は室温で 0.025% coomassie brilliant blue R-200, 45% methanol, 9% acetic acid 溶液により約 2 時間おこない、次いで 7.5% acetic acid と 5% methanol 溶液を交互に数時間おきに交換して約 24 時間脱色をおこなった。

2.5 抗 FgD, 抗 FgE 抗血清ならびに抗 FgE neo 抗血清の作製

抗 FgD, 抗 FgE 抗血清の作製は Marcus and Zinberg¹²⁾ の方法にしたがい、まず Freund's incomplete adjuvant (IATRON 社製) 10 ml と Mycobacterium butyricum (Difco 社製 20 mg を Potter 型 homogenizer で混和し complete adjuvant とした。次に、この adjuvant 0.5 ml と FgD 溶液 (200 μ g/ml) または FgE 溶液 (200 μ g/ml) 0.5 ml を注射筒内で混じ、エマルジョン化したものを、それぞれ正常家兎の背部皮内および太腿筋に multiple injection した。初回注射後、2 週間目に同量をブースター注射し、さらに 2 週間後に頸静脈より全採血して抗 FgD および抗 FgE 抗血清を得た。

次いで高後ら¹³⁾の方法によりフィブリノーゲンをセファロースに固相化させたカラムにこの抗 FgD および抗 FgE 抗血清を通過させフィブリノーゲンと交叉反応を示さない抗 FgD neo ならびに FgE neo 抗体を作製した。まず、Liu and Mertz¹⁴⁾ の方法に準じて市販のヒトフィブリノーゲン (100%) を Lysin sepharose column を通過させ、共存するプラスミン、プラスミノゲンを除去した。一方、0.01 N HCl であらかじめ膨潤した CNBr-activated sepharose 4 B (Pharmacia

Fine Chemicals 社製)をガラスフィルター上で同液 250 ml, 次いで蒸留水 100 ml, 更に 0.5 M NaCl を含む 0.1 M sodium bicarbonate buffer (pH 8.6) 100 ml と順次洗浄し, 活性化させた。これに前述のフィブリノーゲン (20 mg/10 ml) を混和し注射筒 (容量 10 ml) に吸引密封した後 4℃ で回転混和した。24 時間後同ゲルを 0.1 M sodium bicarbonate buffer 250 ml で洗浄し未結合のフィブリノーゲンを除去した。次に 1 M ethanolamine solution (pH 8.0) 10 ml を加え, 2 時間回転混和することにより残存する活性基をブロックした。最後に 1 M NaCl を含む 0.1 M sodium bicarbonate buffer (pH 8.6) 250 ml で 3 回洗浄し, 固相化を終了した。一方抗 FgE 抗血清の 45% 飽和硫酸沈澱物を等量の phosphate buffered saline で溶解し前記のゲルを充填した immuno-absorbent column (1×5 cm) に添加, 吸着せずに通過溶出される分画を集め, 抗 FgDPneo 血清 (Ig G 分画) とした。

2.6 免疫二重拡散法

Ouchterloney¹⁵⁾の方法に従い免疫二重拡散法を行った。つまり 0.1 M borate buffer (pH 8.4) を含む 1% アガーまたはこれに 4% ポリエチレングライコールを含むアガーを用い, 抗原濃度は約 400 µg/ml に調製し 24 時間後に沈降線を判定した。市販の抗フィブリノーゲン抗血清, 抗 FgD, 抗 FgE 抗血清は Behringwerke 社製を用いた。

2.7 ラジオイムノアッセイ法 (RIA)

2.7.1 FgE の ¹²⁵I-Na 標識

Hunter and Greenwood¹⁶⁾の方法にしたがい chloramine T を用いてヨード化を行った。すなわち, 6 µg/ml (0.02 M sodium phosphate buffer pH 7.0) の濃度の精製 FgE を 0.5 M sodium phosphate buffer (pH 7.5) 59 µl に溶解し ¹²⁵I-Na 1 mCi ならびに chloramine T 10 µl (15 mg/10 ml 0.2 M phosphate buffer) を順次加え室温で 45 秒振盪させた後 sodium metabisulfite 50 µl (20 mg/10 ml 0.2 M phosphate buffer) 1 M KI 5 µl を加え標識操作を終了した。¹²⁵I 標識抗原と遊離 ¹²⁵I Na との分離にはあらかじめ 0.1% BSA 含有の 0.02 M Tris HCl pH 7.6-0.01 M EDTA-0.1 M NaCl buffer (TEN buffer) で膨潤してあるセファデックス G-25 (Pharmacia Fine Chemicals 社製) column (0.5×7.5 cm) を用いゲル濾過法により 0.5 ml ずつ分画採取後, 第 1 の放射活性を有するピークを集め標識抗原として用いた。

2.7.2 Assay system

Disposable polystyrene tube (シオノギ社製) (0.5 cm×0.5 cm) に 1% BSA を含む PBS (incubation buffer) を 750 µl ずつ分注し, 各々に ¹²⁵I 標識抗原 (2×10⁴cpm/min に調製) を 50 µl 標準蛋白溶液または患者血清を 100 µl, 特異抗血清を 100 µl 加え, 37℃ で 3 時間水平振盪の後, 正常家兎血清 100 µl 抗家兎 IgG ヒツジ血清 (第 1 ラジオアイソトープ社製) 100 µl を加え, さらに 4℃ で 24 時間インキュベートした。次いで incubation buffer 1 ml を加え充分かくはんした後 4℃, 3000 回転で 45 分間遠心し, 上清を捨て沈澱物の放射活性を LKB Wallac autogamma scintillation counter にて測定した。なお, 本反応に用いた特異抗血清はあらかじめ抗原量を一定として抗血清のみを希釈し総カウントの 50% を得る希釈倍数のものをを用いた。% bound は試料測定カウント (B) と総カウント (T) からそれぞれ抗体未添加の非特異的沈降 (NS: non specific precipitation) のカウントを差し引いた値, $\frac{B-NS}{T-NS} \times 100$ として表わした。Assay は二重検定法で行った。

2.8 対象患者ならびに正常対照者

対象患者は胃癌 27 名, 大腸癌 6 名, 膵癌 4 名, 肺癌 4 名, 肝癌 5 名, 急性骨髄性白血病 9 名, 悪性リンパ腫 4 名の合計 59 名でその内胃癌 1 名, 膵癌の 2 名と急性骨髄性白血病の 5 名は急性 DIC の症状を呈していた。正常対照者として医療従事者 34 名を選んだ。

2.9 フィブリノーゲン値の測定

フィブリノーゲンの測定はクロジン法¹⁷⁾によった。

2.10 Latex 法による FDP 値の測定

Latex による FDP の測定は FDPL テスト (帝国臓器製) を用いた。

3 結 果

3.1 フィブリノーゲンのプラスミンによる分解と FgD, FgE の分離精製

3.1.1 ゲル濾過法ならびに等電点分画法による FgDP の精製

フィブリノーゲンをプラスミンにより分解した産物を経時的に PAGE により調べたところ, Fig. 1 に示すように時間の経過にしたがって易動度は速くなり反応 5 時間では 2 本の幅広いバンドを認めた。この 2 本のバンドは易動度から FgE, FgD に相当すると考えられたため, 次にそれらの分離抽出を試みた。まず, このフィブリノーゲンの 5 時間分解産物をセファデックス G-200 カラムに添加し, ゲル濾過をおこなった (Fig. 2)。Void

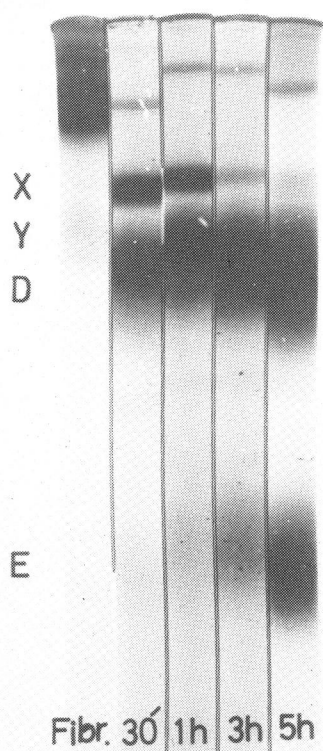


Fig. 1 Polyacrylamide gel electrophoretic pattern of fibrinogen degradation products. Gel concentration is 7%.

30', 1h, 3h and 5h indicate incubation time of fibrinogen with plasmin.

X, Y, D and E represent FgX, FgD, FgE, respectively.

volume に続いて溶出された第2のピークを集め、濃縮後同カラムで再度ゲル濾過をおこない純度を高めた(Fig. 2 挿入図)。次に溶出された主峰を濃縮後カラム等電電気泳動をおこなった。Fig. 3 にそのパターンを示したが pI 6.6 および pI 4.90 の主峰(以下それぞれピーク A, ピーク B とする)を中心に数個の不均一なピークを認めた。これらのピーク A および B を各々別々に分画採取し、2%硫酸に対して透析を繰り返し混在する sucrose, および Ampholine を除去した。

3・1・2 免疫2重拡散法による FgD, FgE の同定

上述のピーク A, B を濃縮し、市販の抗 FgD 抗血清、抗 FgE 抗血清、抗フィブリノーゲン血清(Hoechst 社製)に対して免疫2重拡散法を行った(Fig. 4)。ピーク A の分画は抗 FgD 抗血清および抗フィブリノーゲン抗血清と、ピーク B の分画は抗 FgE 抗血清および抗フィブリノーゲン抗血清と沈降線を形成した。すなわちピーク A の分画は FgD, ピーク B の分画は FgE で

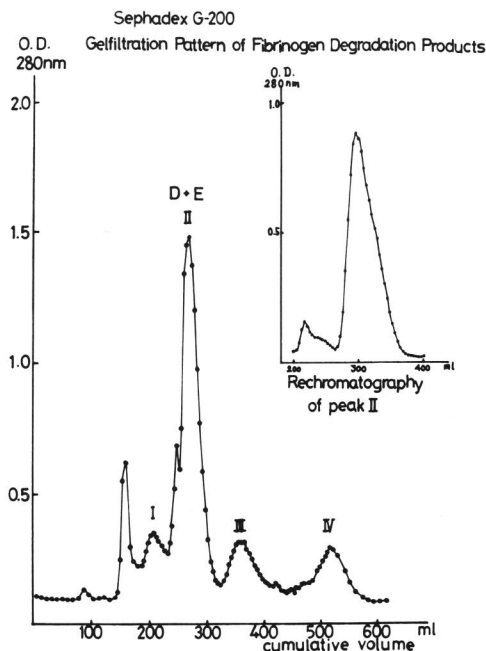


Fig. 2 Gel filtration pattern of fibrinogen degradation products (5 hrs. digest. Rechromatographic pattern of peak II is shown in inserted figure.)

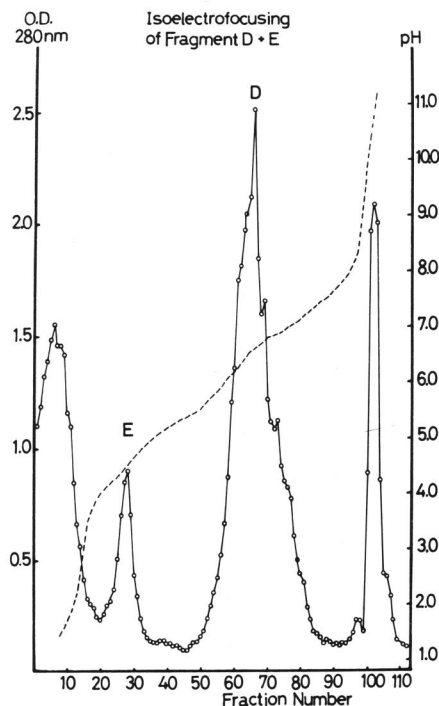


Fig. 3 Isoelectrofocusing profile of peak II from Sephadex G-200 column which contains FgD and FgE.

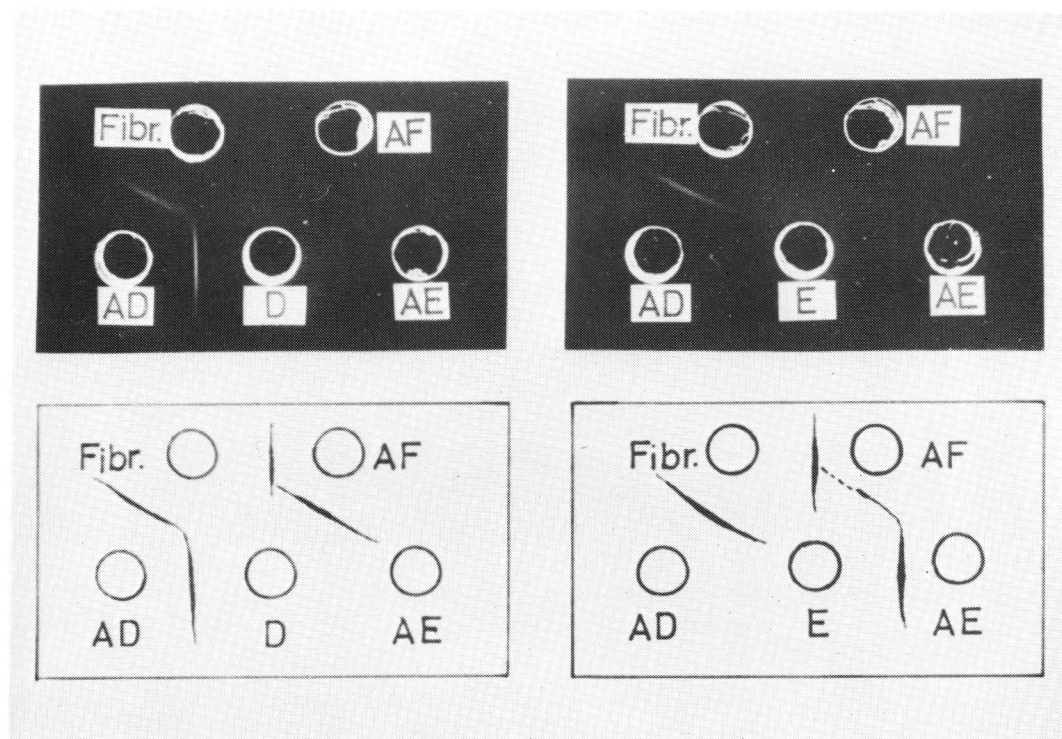


Fig. 4 Double immunodiffusion analysis of FgD and FgE.

Fibr. : fibrinogen
AD : anti-FgD antibody
D : purified FgD
E : purified FgE

AE : anti-FgE antibody
AF : antifibrinogen serum

あり、共にフィブリノーゲンと一部共通抗原性を有すると考えられた。

3・1・3 SDS-PAGE による検索

次にピーク A およびピーク B につき SDS-PAGE を実施した。結果は Fig. 5 に示すようにピーク A は SDS-PAGE 上分子量 82,000, および 86,000 の 2 本のバンドとして泳動され、ピーク B は分子量 32,000 の幅広いバンドとして認められた。これらの分子量はいずれも Marder ら¹⁸⁾ の FgD ならびに FgE のそれに一致していた。

3・1・4 回収率

フィブリノーゲン 10 mg を出発材料として最終的に得られた FgD ならびに FgE の量はそれぞれ 3.4 mg (34%), 2.1 mg (21%) であった。

3・2 抗 FgE neo 抗血清の免疫 2 重拡散法による検討

フィブリノーゲンがプラスミンにより分解を受ける過程ではもともとフィブリノーゲンには存在しない新しい抗原(neo 抗原)の出現が知られている¹⁹⁾。この neo

抗原に特異的な抗血清を得る目的で、精製した FgE を用いて抗 FgE 抗体を作製しその抗血清をフィブリノーゲンを固相化したアフィニティーカラムにより吸収した。Fig. 6 はこのようにして作製した抗 FgE neo 抗血清(AAE)および吸収前の抗 FgE 抗血清(AE)を 4% ポリエチレングライコールを含むアガー中で FgE(E) ならびにフィブリノーゲン(Fibr.)と反応させたものである。抗 FgE 抗血清は FgE と沈降線を形成したが同時にフィブリノーゲンに対し spur formation を認めた。抗 FgE neo 抗血清はフィブリノーゲンとはまったく反応せず FgE とのみ反応した。すなわち抗 FgE 抗血清はフィブリノーゲンとの共通抗原に対する抗体の他に FgE に特有な抗原に対する抗体を含んでおり抗 FgE neo 抗血清は後者に匹敵すると考えられた。なお FgD 抗血清中についても同様な検討をおこなったが抗 FgD neo 抗体の存在が明確でなかったために以後は抗 FgE neo 抗体についてのみ詳細な検討をおこなった。

3・3 抗 FgE neo 抗血清を用いたラディオイムノアッ

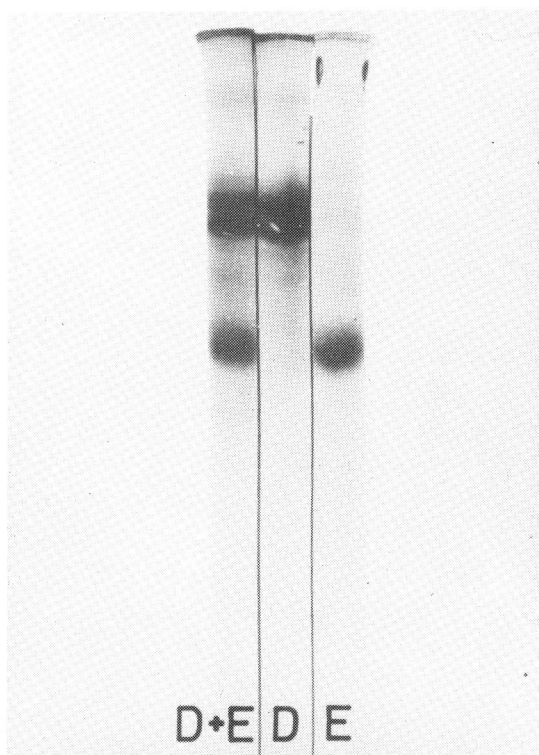


Fig. 5 SDS polyacrylamide gel electrophoretic pattern of purified FgD and AgE

セイ (2 抗体法) の基礎的検討

3.3.1 ^{125}I 標識抗原の放射活性

標識抗原 FgE と遊離型 ^{125}I の分離はセファデックス G-25 を用いたゲル濾過法によった。Fig. 7 にその典型的な溶出パターンを示したが第 1 のピークは ^{125}I 標識抗原 (FgE), 第 2 のピークは遊離の ^{125}I に相当し、各々の放射活性比は 23.4%, 76.6% であった。以後の実験には ^{125}I 標識抗原を 2 万 cpm/50 μl に調整し使用した。

3.3.2 抗 FgE neo 抗血清の最適稀釈倍率の決定

標識抗原の 50% が沈降するいわゆる 50% bound (最適稀釈倍率) を決定するために、抗血清を incubation buffer により 100 倍から 5,000 万倍まで稀釈し、一定量 (2 万 cpm/50 μl) の標識抗原を加え、assay をおこなった。その結果は Fig. 8 に示したように抗 FgE neo 抗血清の最適稀釈倍率はそれぞれ約 44 万倍であった。Fig. 9 は抗 FgE neo 抗血清を用い、トレーサーとして ^{125}I FgE を加えた assay 系におけるフィブリノーゲン、各種 FgDP、フィブリンの 5 時間分解産物との反応性を調べたもので、まず FgE による inhibition は最も強く、それを抗原とした場合測定範囲は 20-5000 ng/ml

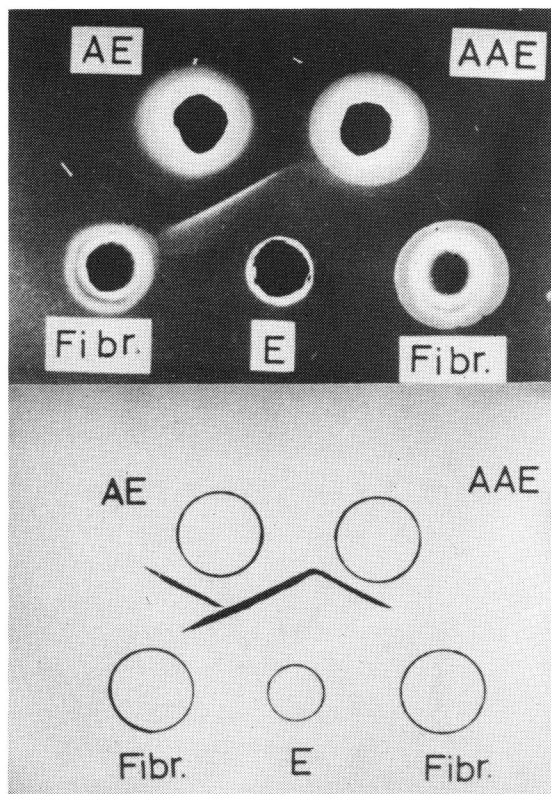


Fig. 6 Double immunodiffusion analysis of anti-E serum absorbed with fibrinogen (anti-FgEneo serum).

AE : anti-E serum
AAE : absorbed anti-E serum
Fibr. : fibrinogen
E : FgE

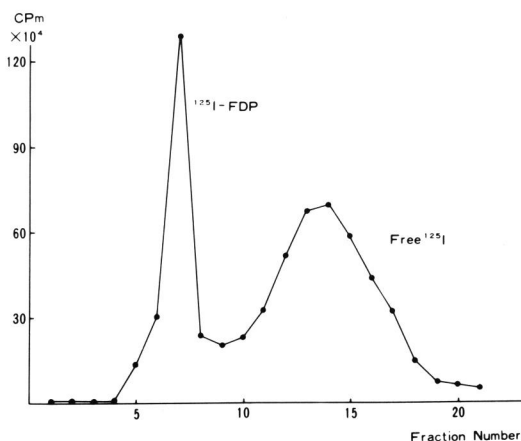


Fig. 7 Separation of ^{125}I bound FDP from free ^{125}I by gel filtration on Sephadex G-25 column.

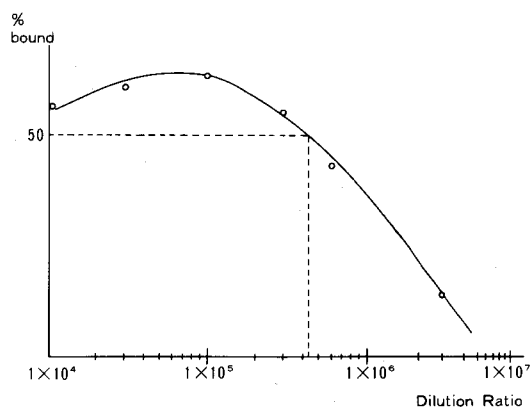


Fig. 8 Titration curve of anti-FgEneo serum in radioimmunoassay (double antibody method)

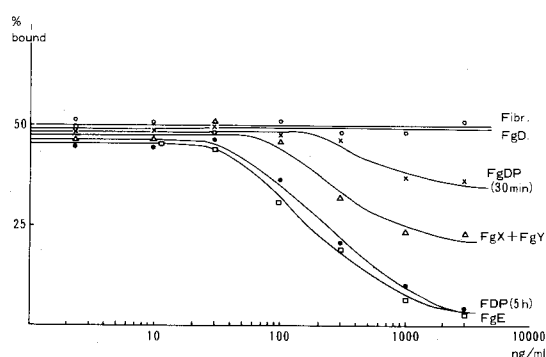


Fig. 9 Competitive inhibition of anti FgEneo serum by fibrinogen (Fibr.), FgD, 30 minutes digest of fibrinogen (FgDP, 30 min.) FgX+FgY, 5 his. digest of fibrin (FDP 5 hrs.) and FgE in radioimmunoassay.

であった。一方 FgD ならびにフィブリノーゲンとの交叉反応性はまったく認められず、免疫 2 重拡散法の所見と考え併せると FgE neo 抗血清は FgD およびフィブリノーゲンには存在しない neo 抗原に対して特異的に反応することが確かめられた。しかしフィブリノーゲンをプラスミンで 30 分間分解した産物 (FgDP 30 min), FgX+FgY ならびにフィブリンの 5 時間分解産物は明らかに交叉反応性を示した。

3.4 正常人および悪性腫瘍患者の血清中ならびに血漿中の FgE neo 値

Fig. 10 は抗 FgE neo 抗血清を用いた assay 系による正常人と各種悪性腫瘍患者の血清中ならびに血漿中の FgE neo 値を示している。血清値で正常人 34 名の平均値は血清で 173 ± 78 ng/ml, 血漿で $2,327 \pm 1,623$ ng/ml, 悪性腫瘍患者 51 名 (急性 DIC 8 症例を除く)

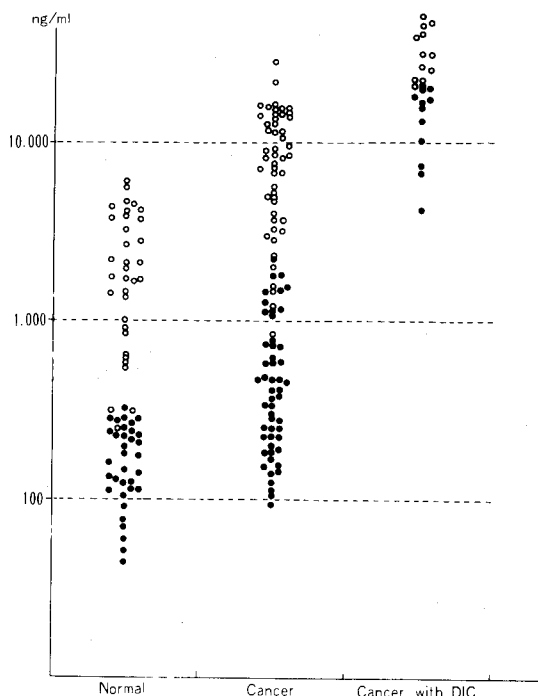


Fig. 10 Serum and plasma FgEneo concentrations in normal subjects and cancer patients with or without DIC.

の平均値は血清で 592 ± 524 ng/ml 血漿で $9,459 \pm 5,788$ ng/ml であった。血漿 FgE neo 値は血清 FgE neo 値に比していずれも高値であり、また悪性腫瘍患者が正常値に比して異常高値をとる比率は血清値で 64% 血漿値で 78% であった。なお急性 DIC 8 症例の血漿 FgE neo 値 (平均 $33,241 \pm 10,616$ ng/ml) 血清 FgE neo 値 (平均 $13,690 \pm 5,690$ ng/ml) はすべて正常値の数倍ないし数十倍であった。

3.5 胃癌患者の各 Stage における FgE neo 値

胃癌症例を臨床的に胃癌取り扱い規約に従って 2-4 期に分類し、その FgE neo 値を調べた。Fig. 11 にその結果を示したが、血漿値、血清値は共に Stage が進行するにつれて明らかに上昇した。第 4 期の中には骨髄癌症を伴った DIC の一症例が含まれている。

3.6 血清 FgE neo 値と Latex 法による血清 FDP 値との比較検討

無作意的に抽出した悪性腫瘍患者 (急性 DIC 症例 8 名を含む) 32 名ならびに正常人 14 名を対象とし、従来用いられてきた Latex 法による血清 FDP 値と、血清 FgE neo 値との比較検討をおこなった (Fig. 12)。両者の間にはおおむね良好な正の相関が認められ、相関係

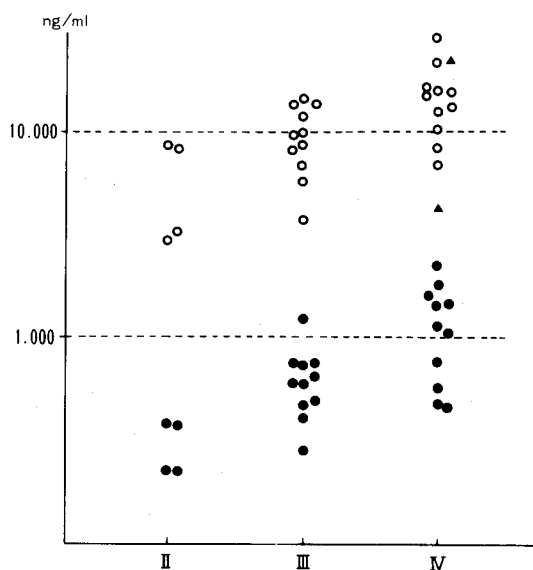


Fig. 11 Serum and plasma FgEneo concentrations at various stages of stomach cancer.

数は $r=0.84$ であった。しかし悪性腫瘍患者の中には Latex 法で $10 \mu\text{g/ml}$ 以下の正常値を示しながらも FgE neo 値で異常高値をとるものが 41% に認められた。

3.7 血漿 FgE neo 値と血清 FgE neo 値の比較検討

正常人における血漿 FgE neo 値と血清中 FgE neo 値の相関は $r=0.68$ と比較的良好な相関を認めたが悪性腫瘍患者においては $r=0.36$ と明らかな相関は認められなかった。ただし急性 DIC の 8 症例は $r=0.86$ ときわめて良い相関を示した (Fig. 13)。

3.8 急性 DIC 症例における血中 FgE neo 値の検討

Fig. 14 は経過中に急性 DIC 症状を呈した急性骨髄性白血病の症例における FgE neo 値の変動を調べたものである。入院当初より血漿中の FgE neo は高値を示しており、次第に血清の FgE neo 値も Latex 法による FDP 値に先がけて上昇し、DIC 症状を呈した。ただちにヘパリン療法を開始したところ DIC 症状の改善にともない血清 FgE neo 値は正常化した。しかし血漿 FgE neo 値は軽度の低下をみたのみで、その後も異常高値を持続した。ヘパリン投与を中止したところ、血清 FgE neo 値は正常範囲内にあったが、血漿 FgE neo 値は直後から漸増し 10 日後には血清 FgE neo 値も再上昇し始め明らかな DIC へと移行した。

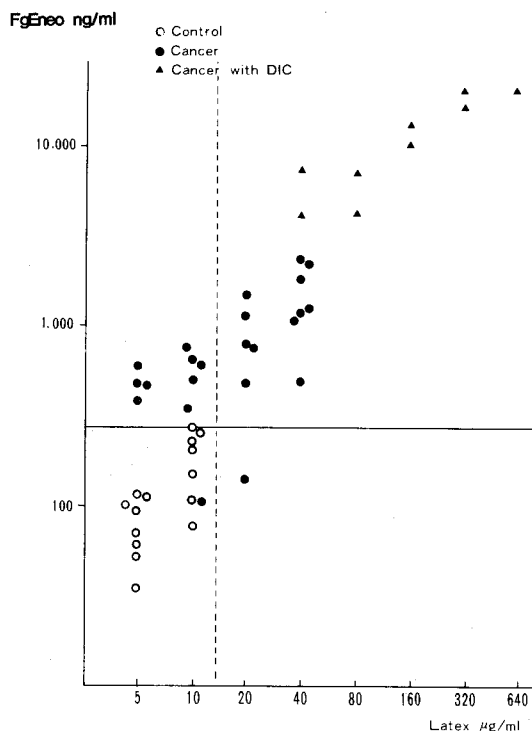


Fig. 12 Relationship between serum FgEneo values and serum FDP values determined by latex agglutination test.

考 察

1865 Trousseau²⁰⁾が悪性腫瘍患者の recurrent migratory thrombophlebitis について記載して以来、悪性腫瘍に血栓症が高頻度に合併することが諸家の指摘するところとなり、その原因として担癌生体では過凝固状態になりやすいという考え方が明らかにされてきた²¹⁾。すなわち担癌生体ではフィブリノーゲンをはじめとする各種凝固因子が増加する一方線溶能が低下し、血液組成がきわめて凝固しやすい特性を獲得すると考えられている。このような過凝固状態はいわば、凝固準備状態でもあるために、わずかな誘因により容易に播種性血管内凝固症候群 (DIC) へと移行し、逆に凝固因子の消耗と二次線溶の亢進が起り、結果として重篤な出血傾向を呈するようになる。したがって悪性腫瘍患者においては凝固線溶の異常、ことに DIC への移行を正確に把握し、早期に対処することが必要となってくる。

このような凝固線溶の異常を把握する手段の一つに FDP の測定がある。FDP はフィブリンまたはフィブリ

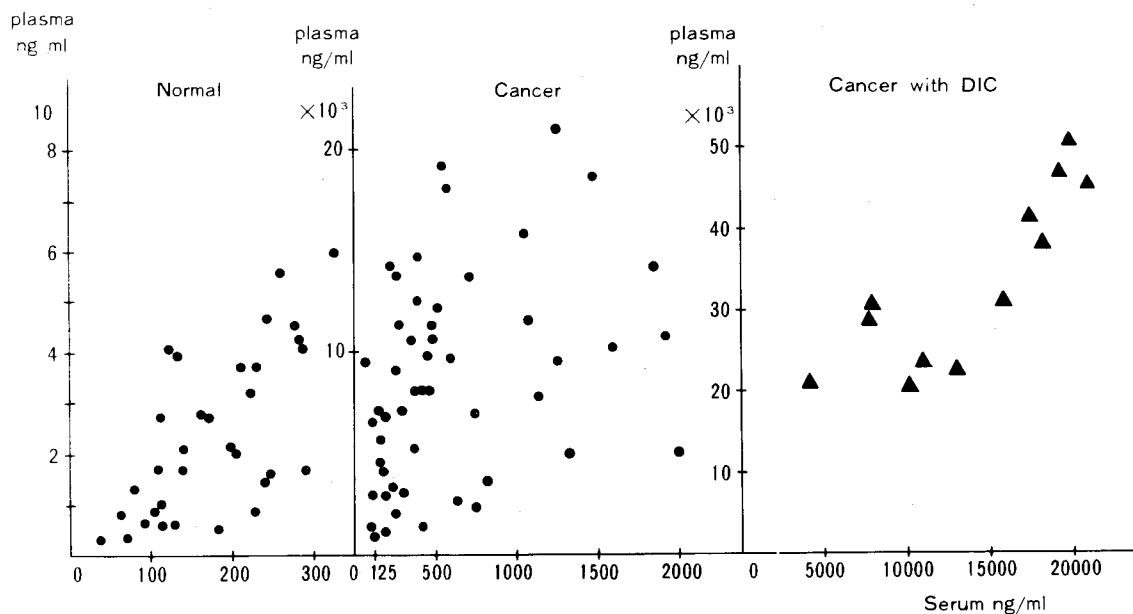


Fig. 13 Relationship between serum FgEneo values and plasma FgEneo values in normal subjects and cancer patients with and without DIC.

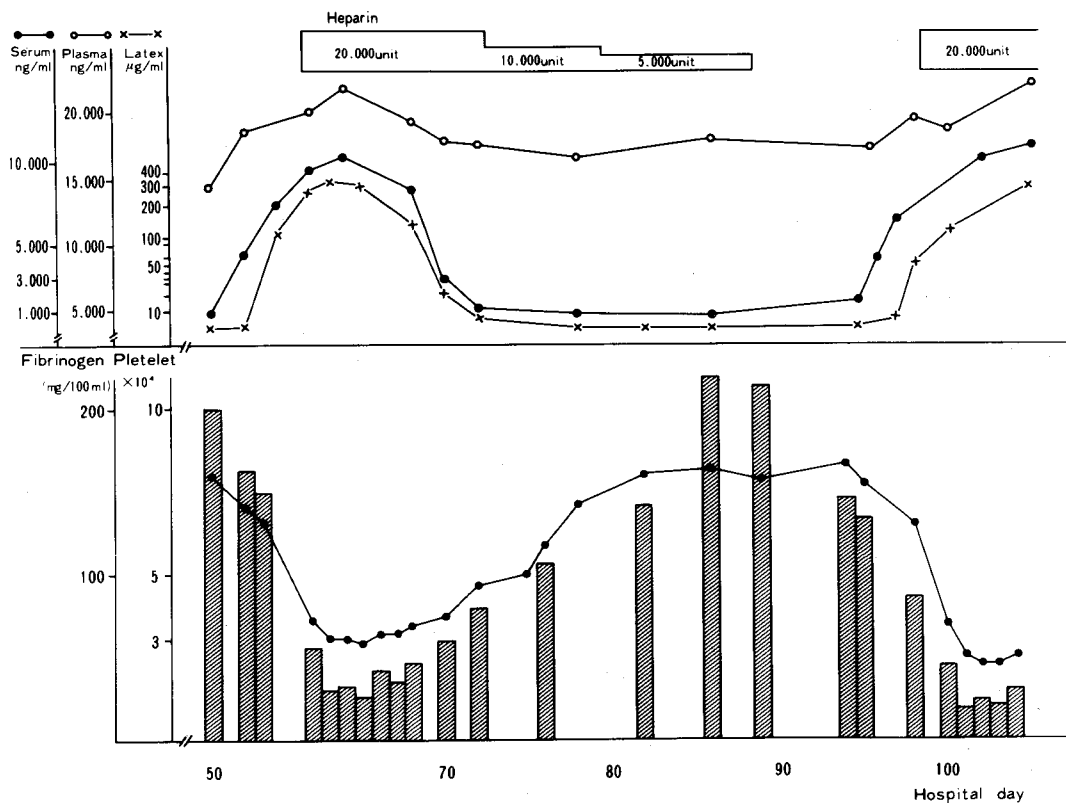


Fig. 14 Alteration of serum FgE values in patient with acute DIC (acute myelogenous leukemia).

ノーゲンがプラスミンの作用により分解されて生ずる産物で、直接的には線溶活性を反映して変動する。しかし、凝固活性の上昇も結果的には二次線溶を活性化させるために FDP を測定することにより多くの場合間接的に凝固活性を伺い知ることができる。FDP はその分解の程度により Fragment X (分子量約 240,000) Y (分子量約 160,000), D (分子量 83,000-100,000) E (40,000-60,000) などに分類され、前 2 者は早期分解産物 (early product) 後 2 者は晚期分解産物 (late product) と呼称されている²²⁾。

血清中のフィブリンまたは fibrinogen degradation product (FDP) を測定しようとする試みは 1963 年 Ferreira and Murat²³⁾により初めて記載された。彼らは試料血清を抗フィブリノーゲン抗体も試験管内で反応させ、生じた反応物を懸濁度としてとらえる方法、すなわち fibrin degradation flocculation test (FDFT) を発表した。しかしこの方法は最低検出値が 20 $\mu\text{g/ml}$ と感度が悪く、また測定値の信頼度にも不満が残ったために臨床的な実用にはいたらなかった。その後 Mersky *et al.*²⁴⁾ Allington²⁵⁾らはそれぞれ Tanned red cell hemagglutination inhibition immuno assay (TRCHII) および Latex Clumping Method を導入し、微量定量化を進めた結果、数 $\mu\text{g/ml}$ までの測定が可能となり、現在一般にはこのいずれかの方法が臨床検査法として広く用いられている。ところがこれらの方法はいずれも倍数稀釈法により測定値を得るために、値が不連続的となり、また凝集反応の終点を判定する際に主観的判断に頼らざるを得ない。加えて感度においても必ずしも充分とはいいがたく、正常値と異常値の境界領域の微妙な判定や逆に低線溶状態の検出などに困難を感じることが少なくない。1971 年 Catt *et al.*²⁶⁾はこれらの問題を克服するために FDP のラディオイムノアッセイ法を開発した。彼らの方法は抗フィブリノーゲン抗体を固相化し、トレーサーとして ¹²⁵I 標識フィブリノーゲンを用いる、いわゆる immuno-radiometric assay で、測定範囲は 25-500 ng/ml と、極微量の測定値を得ることが可能であった。しかし本法を含めこれまで述べた測定法はいずれも抗フィブリノーゲン抗体を用いているために血清中に残存するフィブリノーゲンをも検出してしまうという危険性があった。このことはヘパリンなどを用いた抗凝固療法中の血清や、血餅形成が不十分な血清を取り扱うときにしばしば問題となるところである。また抗フィブリノーゲン抗体は FgD や FgE などの late product との交叉反応性が弱いために真に正確な FDP を測定しているか

どうかという疑問も残る。Gordon *et al.*²⁷⁾はその点を解決するために late product (FgD, EgE) を抗原とし、作製した抗体をフィブリノーゲンで吸収することにより FDP に特異的な RIA 法を開発した。

本法は血清 FDP 測定に際して、フィブリノーゲンに妨げられることなく、また late product を正確に把握する上で有用であるが、その上に血漿中の FDP をも測定しうるという利点を有している。血漿 FDP 測定の意義は、血清分離の際に血餅に巻き込まれ除かれる可能性の高い clottable FDP (early product) をも確実に検出しうることである。このような観点から本研究では FgE neo 抗体を用い (FgD neo 抗体は後述の理由で使用しなかった) 悪性腫瘍患者の血清中ならびに血漿中 FDP 値の測定を行った。まず RIA 法は基本的に Gordon *et al.*³⁾の方法に従ったが、抗原の分離精製法には一部改良を加えた。これまで FDP の分離精製としては Pevikon²⁸⁾ や Polyacrylamide²⁹⁾を用いる調製用電気泳動法によるもの、セファデックス G-200 と、CM セルロールを組み合わせた方法³⁰⁾などが報告されてきた。しかしいずれの方法も純度の高い抗原を大量に得るのには不十分であった。われわれの方法はセファデックス G-200 によるゲル濾過法と、等電点電気泳動法を組み合わせたものでフィブリノーゲン 10 mg を出発材料とし FgE, FgD の回収率がそれぞれ 21%, 34% と、比較的容易に大量の抗原を分離精製することが可能であった。得られた 2 種の抗原はそれぞれ市販の抗 FgE 抗体、抗 FgD 抗体と免疫二重拡散法で沈降線を形成し、SDS-PAGE による分析でも Marder *et al.*¹⁸⁾の FgE, FgD の分子量に一致した。すなわち両抗原は FgE, FgD であることが確認された。それらを免疫して得た抗血清は RIA (二抗体法) による inhibition assay でいずれもフィブリノーゲンとは反応しながらもお互いの間では交叉反応性が認められなかった。このことは FgE と FgD がフィブリノーゲン分子を構成する異なったペプチド (N 末端側と C 末端側) に由来することを反映している。そこで Gordons *et al.*²⁷⁾の方法にしたがい FgE と FgD の neo 抗体を作製し、再び免疫二重拡散法により検討したところ、前者はフィブリノーゲンとは反応せず FgE とのみ沈降線を形成したが、後者はフィブリノーゲンはもとより FgD との沈降線も認められなかった。FgD neo 抗体の作製が不可能であった理由としては、免疫動物の個体差、FgD neo 抗原の抗原性が低いことなどが推測された。なお FgE neo 抗体を検出する際に通常のアガー中では沈降線を形成せず、4% ポリエチレングライコールを含むアガー中で、はじめて沈降線が

認められたことからこの neo 抗体は Harrington *et al.*³¹⁾ のいう非沈降性抗体であると考えられる。本抗体を用いた RIA の標準曲線は 20-5,000 ng/ml と比較的広範囲の測定域を有し、最少検出感度も後に述べる正常下界値を検出するのに充分であった。その際、early degradation product による inhibition curve を検討したところ、本 assay 系はフィブリノーゲンの 30 分分解産物、FgX+FgY などにより強く抑制された。すなわち FgE の neo 抗原はフィブリノーゲンの分解過程のきわめて早期の段階で出現すると考えられ、この点に関して Pizzo *et al.*³²⁾ はフィブリノーゲンの分解過程を円偏光 2 色性で調べた結果、分解の極初期に大きな立体構造の変化が起ることを指摘しており、おそらくはその変化に伴って neo 抗原が蛋白表面に露出し、抗原性を獲得するものと推測される。換言すると、本 assay は late product の FgE のみならず early product をも検出しうることを意味している。

以上の如き基礎的検討に基づき次に悪性腫瘍患者の FDP 値について検討を加えた。悪性腫瘍患者では一般に急性 DIC の症例に限らず過凝固状態を反映し血清 FDP が異常高値をとることが知られている。Davis *et al.*³³⁾ によれば 9%，Miller *et al.*³⁴⁾ Peck and Reiquam³⁵⁾ らは 22%，神前ら³⁶⁾ は 26% の症例に上昇を認めている。今回われわれはまず正常人の FgE neo 値を調べたところ、血清値は 173 ± 78 ng/ml、血漿値は $2,327 \pm 1,623$ ng/ml と後者が前者に比べ明らかに高値であった。理由は前にも述べたように血清分離の操作で Clottable FDP または early product などが血清中から除かれたためと考えられる。悪性腫瘍患者の血清ならびに血漿 FDP 値はやはり上述の理由から後者が高値をとったが、それぞれの平均値は急性 DIC を伴った症例で $13,690 \pm 5,690$ ng/ml および $33,241 \pm 10,610$ ng/ml、それ以外の症例でも 592 ± 524 ng/ml、 $9,459 \pm 5,788$ ng/ml といずれも正常値より有意に高値であった。また異常高値を示した症例の比率は急性 DIC を伴ったものでは当然 100% であったが、それ以外の症例においても血清値からみて 64%、血漿値からみて 78% と高く、しかも病期の進行に従って上昇傾向がみられた。この異常高値の率は血清 FgE neo 値に限っていても上述の諸家の報告に比べてはるかに高率であったが、それは従来の測定法では倍数希釈法を用いているために正常値附近の微妙な上昇が不明であったのに対し本法では正常上昇値が明確に数値として把握できたことが一因と考えられる。実際 Latex 法では正常値であるにもかかわらず血清 FgE neo 値が異常高値を示した症

例が 41% にみられた (Fig. 12)。

血漿中の FgE neo 値は血清中のそれに比べてより高率に異常高値をとったわけだが、それは悪性腫瘍患者の血漿中でフィブリノーゲンの早期分解産物が増加しているという石川³⁷⁾ の報告を裏付けるものであり、同時に血漿 FgE neo 値の測定が過凝固状態を知る上でより有用であることを示している。すなわち血漿値が上昇していながら血清値が正常である場合 (Fig. 13) には、ある程度の凝固亢進がありながらも二次線溶はそれほど進んでいないことを意味しており、初期の過凝固状態にあるものと解釈しうる。一方血清、血漿の両値が増している場合には、二次線溶も亢進していると考え、DIC への移行を想定して経過を追う必要がある。事実急性 DIC の症例を経過を追って調べたところ、DIC に至る以前にすでに血漿値が高値を示し、次いで血清値も上昇して最終的に DIC を呈した。またその際治療としてヘパリン投与を行ったところ漸次血清 FDP neo 値は減少したが血漿 FgE neo 値は高値を持続し、過凝固状態が潜在していることを明確に反映していた。ヘパリン投与を中止し一週間後には DIC が再発した。

結 論

抗 FgE neo 抗体を用いた RIA 法を確立し、癌患者血中の FDP 値を検討したところ、以下のような結論を得た。

1) セファデックス G-200 カラムを用いたゲル濾過法とカラム等電点電気泳動法を組み合わせることにより、フィブリノーゲンのプラスミン分解産物である FgE と FgD とを効率よく大量に分離、精製することが可能であった。

2) FgE を抗原として作製した抗血清を、フィブリノーゲンを固相化したアフィニティーカラムにより吸収し、抗 FgE neo 抗血清を得た。そこに含まれている抗体はポリエチレンジアミン中ではじめて抗原との沈降物を形成したために、いわゆる非沈降性抗体と考えられた。

3) 次にこの抗血清を用いて 2 抗体法による RIA を確立した。本法における各種 FDP の反応性を調べたところ、FgD は交叉反応を全く示さなかったが、FgE はもとより、FDP の early product である、FgX、フィブリノーゲン 30 分分解産物、フィブリン 5 時間分解産物などと反応した。また本法はフィブリノーゲンを全く検出しないために、血清 FDP のみならず血漿 FDP の測定にも適していた。

4) FgE を標準抗原とした時の本法の測定範囲は 20

ng/ml \sim 5,000 ng/ml であった。

5) 本法で測定した正常人の血清 FgE neo 値は 173 ± 78 ng/ml 血漿 FgE neo 値は $2,327 \pm 1,623$ ng/ml と、後者が約 13 倍の高値を示した。これは血清分離の際にフィブリノーゲンの初期分解産物 (early product) が血餅にまき込まれて除かれるためと考えられた。

6) 本法による癌患者の血清 FgE neo 値は 592 ± 524 ng/ml 血漿 FgE neo 値は $9,459 \pm 5,788$ ng/ml と、やはり上述の理由で後者が前者より高値であった。また正常人の値と比較して異常高値をとる率は血清値で 64% 血漿値で 78% と従来の Latex 法, HIT 法に比べはるかに高率であった。

7) Latex 法による血清 FDP 値と本法による血清 FgE neo 値は $r=0.84$ と比較的良好な正の相関を認めたが、血清 FgE neo 値と血漿 FgE neo 値の間には正常人で $r=0.68$, 癌患者で $r=0.36$ といずれも明らかな相関は認められなかった。ことに癌患者ではその傾向が強く過凝固状態でフィブリノーゲンの初期分解産物が血漿中に増加することを反映していると考えられた。急性 DIC では全例が、血清 FgE neo 値, 血漿 FgE neo 値ともに増加していた。

8) 急性 DIC の症例において血中 FgE neo 値の変動を検討したところ、血清 FgE neo 値は抗凝固剤 (ヘパリン) 治療により低下したが、血漿 FgE neo 値は潜在する過凝固状態を反映し高値を保ち、短時間の後再発した。以上血漿中 FgE neo 値の測定は癌患者の過凝固状態の把握, DIC の監視等に有用と考えられた。

謝 辞

稿を終るにあたり御指導, 御校閲をいただいた漆崎一朗教授, また御協力いただいた本学内科学第 4 講座の各位に対し深く感謝いたします。

文 献

- Merskey, C., Aleiner, G. J. and Johnson, A. G.: Quantitative estimation of split products of fibrinogen in human serum relation to diagnosis and treatment. *Blood* **28**, 1-18 (1966).
- Melliger, E. J.: Detection of fibrinogen degradation products by use of antibody coated latex particles. The possibilities and limits of the method. *Thromb. Diath. Haemorrh.* **23**, 211-227 (1970).
- Gordon, Y. B., Martin, M. J., Landon, T. and Chard, T.: The development of radioimmunoassay for fibrinogen degradation products fragment D and E. *Br. J. Haematol.* **29**, 107-119 (1975).
- Ratky, S. M., Martin, M. J., Gordon, Y. B., Baker, L. R. I. and Chard, T.: A comparison between radioimmunoassay and other immunological techniques for the measurement of fibrinogen/fibrin degradation products in serum. *Br. J. Haematol.* **30**, 145-149 (1975).
- 石川邦嗣, 近江直仁, 漆崎一朗: 人 fibrinogen の heterogeneity に関する研究, 第 4 報—等電点分画からみた fibrinogen の分解過程—. *生物物理化学* **19**, 84-85 (1974)
- Vesterberg, O. and Svensson, H.: Isoelectric fractionation, analysis and characterization of ampholites in natural pH gradient. IV. Further studies on the resolving of myoglobins. *Acta Chem. Scand.* **20**, 820-834 (1966).
- Ayod, S. R., Bonsall, R. W. and Hunt, S.: A simple method for the production of accurate linear gradient using a constant speed peristaltic pump. *Sci. Tools* **14**, 40-43 (1967).
- 堀尾武一, 松尾雄志, 中村敏一: 等電点分画法による蛋白質の分画についての私見, *Isozyme と編成能*. *生物物理化学* **14**, 119-126 (1969).
- 品田章二: フィブリン体分解物, FDP と生成とその週辺. *日血学会誌* **35**, 607-616 (1972).
- Clarke, J. T.: Simplified "disc" (polyacrylamide gel) electrophoresis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **121**, 426-436 (1964).
- Weber, K. and Osborn, M.: The reliability of molecular weight determination by dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* **244**, 4406-4412 (1969).
- Marcus, D. M. and Zinberg, N.: Isolation of ferritin from human mammary and pancreatic carcinomas by means of antibody immunoabsorbants. *Arch. Biochem. Biophys.* **162**, 493-501 (1974).
- 高後 裕, 新津洋司郎, 渡辺直樹, 大塚 忍, 小関純一, 柴田恵子, 漆崎一朗: 血清 ferritin の radioimmunoassay 法とその消化器疾患における臨床的応用に関する研究. *日消誌* **73**, 1553-1566 (1976).
- Liu, T. H. and Mestz, T. E.: Studies on plasminogen IX purification of human from Cohn Fraction III by affinity chromatography. *Canad. J. Biochem.* **49**, 1055-1061 (1971).
- Ouchterloney, Ö.: *In vitro* method for testing the toxinproducing capacity of diphtheria bacteria. 8th Scandinavian Pathological Congress 1947. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* **25**, 186-191 (1948).
- Hunter, W. M. and Greenwood, F. C.: Prepa-

- ration of iodine-131 labelled human growth hormone of high specific activity. *Nature* **194**, 495-496 (1962).
17. Quick, A. J.: The physiology and pathology of hemostasis. Hemorrhagic diseases and thrombosis. Lea and Febiger, Philadelphia. 1951-1958 (1966).
 18. Marder V. J., Budzynski A. Z.: Data for defining fibrinogen and its plasmic degradation products. *Thromb. Diath. Haemorrh.* **33**, 199-207 (1975).
 19. Plow, E. and Edginton, T. S.: Immunobiology of fibrinogen. Emergence of neoantigenic expressions during physiologic cleavage *in vitro* and *in vivo*. *J. Clin. Invest.* **52**, 273-282 (1973).
 20. Trousseau, A.: Phlegmasia alba dolens. Clinique médicale de l'Hotel-Dieu de Paris, London. The new symdenham Society. **3**, 94-98 (1865).
 21. Cooper, H. A., Bowie, E. J. W. and Owen, C. A.: Evaluation of patients with increased fibrinolytic split products in their serum. *Mayo Clin. Proc.* **49**, 654-657 (1974).
 22. Marder, V. J. and Shulman, N. R.: High molecular weight derivatives of human fibrinogen produced by plasmin. *J. Biol. Chem.* **244**, 2120-2124 (1969).
 23. Ferreira, H. C. and Murat, L. G.: An immunological method for demonstrating fibrin degradation products in serum and its use in the diagnosis of fibrinolytic states. *Br. J. Haematol.* **9**, 299-310 (1963).
 24. Merskey, C., Johnson, A. J. and Kleiner, G. J.: A rapid, simple, sensitive method for measuring fibrinolytic split products in human serum. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **131**, 871-875 (1969).
 25. Allington, M. J.: Detection of fibrin(ogen) degradation products by a latex clumping method. *Scand. J. Haematol. Suppl.* **13**, 115-119 (1971).
 26. Catt, K. J., Hirsh, J., Castelan, D. J., Miall, H. D. and Tregear, G. W.: Radioimmunoassay of fibrinogen and its proteolysis products. *Thromb. Diath. Haemorrh.* **20**, 1-6 (1968).
 27. Gordon, Y. D., Martin, M. J., McNeile, A. T. and Chard, T.: Specific and sensitive determination of fibrinogen degradation products by radioimmunoassay. *Lancet* **2**, 1168-1170 (1973).
 28. Marder, V. J., James, H. L. and Sherry, S.: The purification of fibrinogen degradation products by Pevicon Block electrophoresis. *Thromb. Diath. Haemorrh.* **22**, 234-239 (1969).
 29. Prentice, C. R. M., Edgar, W. and McNiccol, G. P.: Characterization of degradation products in patients on anticoagulant therapy (comparison with fibrinogen). *Br. J. Haematol.* **27**, 77-87 (1974).
 30. Budzynski, A. Z., Stahl, M., Kopec, M., Latallo, Z. S. and Wegrzynowicz, Z.: High molecular weight products of the late stage of fibrinogen proteolysis by plasmin and their structural relation to the fibrinogen molecule. *Biochim. Biophys. Acta* **147**, 313-323 (1967).
 31. Harrington J. C., Fenton, J. W. and Pert, J. H.: Polymer-induced precipitation of antigen-antibody complexes: 'preciplex' reactions. *Immunochemistry* **8**, 413-421 (1971).
 32. Pizzo, S. V., Schwartz, M. L., Hill, R. L. and McKee, P. A.: The effect of plasmin on the subunit structure of human fibrinogen. *J. Biol. Chem.* **247**, 636-645 (1972).
 33. Davis, R. B., Theologides, A. and Kennedy, B. J.: Comparative studies of blood coagulation and platelet aggregation in patients with cancer and nonmalignant diseases. *Ann. Intern. Med.* **71**, 67-80 (1969).
 34. Miller, S. P., Sanchez-Avalos, J., Stefanski, T. and Zuckerman, L.: Coagulation disorder in cancer. I. Clinical and laboratory studies. *Cancer* **20**, 1452-1465 (1967).
 35. Peck, S. D. and Reigum, C. W.: Disseminated intravascular coagulation in cancer patients. Supportive evidence. *Cancer* **31**, 1114-1119 (1973).
 36. 神前五郎, 今岡真義, 井下勝男, 石井啓子: 癌とDIC. *癌と化学療法* **2**, 588-595 (1975).
 37. 石川邦嗣: 人血中Fibrinogenのmicroheterogeneityに関する研究. *札幌医誌* **48**, 304-320 (1979).

別刷請求先:

(〒060) 札幌市中央区南1条西17丁目

札幌医科大学内科学第4講座 及川潤一